



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Degradación de rojo congo mediante la enzima lacasa del hongo
Trametes versicolor (Fungi Basidiomycota)**

TESIS PROFESIONAL POR ETAPAS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A:
JAQUELINE CHÁVEZ GARCÍA

DIRECTORA

Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal

CUERNAVACA, MORELOS

JUNIO 2023

Agradecimientos

Principalmente quiero agradecer a dios por permitirme cumplir mis metas

A la Dr. Elba Villegas mi directora de tesis por aceptarme en su laboratorio, su tiempo y sus aportaciones al proyecto y sobre todo por su paciencia.

Al Dr. Leonardo David por sus enseñanzas, sus comentarios, su paciencia y su tiempo.

A mis compañeros de laboratorio LEFIP sobre todo a Moni, Angi y Eli por sus enseñanzas y sobre todo su tiempo.

A mis amigas Karla, Yare y Ari que siempre estuvieron para mí, apoyándome escuchándome y ayudando a mejorar.

Dedicatoria

A mis papás por su amor incondicional por siempre aconsejarme y apoyarme en todas mis decisiones por que sin ellos nada de esto sería posible gracias por siempre confiar en mi a pesar de todo.

A mis abuelos y mis hermanos Emmanuel y Yami por siempre apoyarme en todo por sus palabras de aliento y por su cariño.

Resumen

El potencial de los hongos de la podredumbre blanca en la biorremediación ha sido ampliamente estudiado para la degradación de diversos contaminantes xenobióticos esta degradación se puede llevar a cabo mediante algunas enzimas producidas por los hongos como la lignino peroxidasa, manganeso peroxidasa y lacasas el hongo *Trametes versicolor* se ha utilizado en la eliminación de diversos colorantes debido a su producción de lacasas esta puede llevarse a cabo por biosorción, absorbiendo el colorante mediante su biomasa o por degradación mediante sus enzimas.

En este trabajo se evaluó la degradación del colorante azo rojo congo mediante la lacasa del hongo *Trametes versicolor*, se utilizaron los medio HIT, M17, M17 con CuSO₄ y M24 medios estandarizados en el laboratorio, en el crecimiento en sólido el mejor medio fue el HIT. En el crecimiento en sólido y en líquido no se utilizó el medio HIT. En el crecimiento en líquido se evaluó producción de biomasa, lacasas y degradación del colorante, se realizó un cinética en matraces de 500 ml con 300 ml durante 16 días el colorante se utilizó a diferentes concentraciones 125, 250 y 500 ppm de rojo congo y un control sin colorante solo el medio cada uno por triplicado se utilizó el agitador a 129 rpm, se obtuvo mayor biomasa en el medio M17 con CuSO₄ al día 16 se obtuvo 3.69 g/L, la producción de lacasas y la degradación se midieron en el espectrofotómetro en el medio M24 hubo una mayor producción de lacasas 20533 U/L en el día 10 de la cinética, y el mayor porcentaje de degradación del 80%.

Índice

1. INTRODUCCION	1
1.1 Producción y consumo de colorantes en el mundo.	1
1.2 Producción y consumo de colorantes en México	2
1.3 Colorantes	3
1.4 Contaminación por colorantes.	3
1.5 Métodos para el tratamiento de aguas residuales con colorantes.	4
1.5.1. Tratamientos químicos.	4
1.5.2 Tratamientos físicos.	5
1.5.3 Tratamientos biológicos.	5
2. ANTECEDENTES	6
2.1 Hongos de podredumbre blanca.	6
2.2 Lacasas de hongos.	6
2.3 <i>Trametes versicolor</i>	7
2.3.1 <i>Trametes versicolor</i> taxonomía y descripción	8
2.4 Aplicaciones	9
2.5 Antecedentes directos	9
2.6 Rojo Congo	11
3. JUSTIFICACIÓN	12
4. HIPÓTESIS	14
5. OBJETIVO GENERAL	14
5.1. OBJETIVOS ESPECIFICOS	14
6. METODOLOGÍA	15
6.1 Material biológico	15
6.2 Obtención del inóculo	15
6.3 Cultivo en agar con el medio HIT Y M17	15
6.3.1 Composición del medio HIT	16
6.3.2 Composición del medio M17	16
6.4 Medios de cultivo en líquido M17 y M24	16
6.4.1 Medio M24	16

6.4.2 Cultivo en los Medios M17 y M24	16
6.5 Medición de biomasa húmeda y seca de cultivo en matraz	17
6.6 Medición de actividad de lacasas	17
6.7. Determinación espectrofotométrica de concentración de Rojo Congo	17
6.8 Zimogramas	17
6.9 Análisis estadísticos	18
7. Resultados	18
7.1 Obtención de los inóculos	18
7.2 Cultivo en agares HIT y 17 con 125, 250 y 500 ppm.....	18
7.2.1. Velocidad de Crecimiento radial en caja de Petri en agar HIT con rojo Congo y con CuSO ₄	19
7.2.2 Velocidad de Crecimiento radial en caja de Petri en agar HIT con rojo Congo y CuSO ₄	19
7.2.3 Velocidad de Crecimiento radial en caja de Petri en agar medio M17 con rojo Congo sin CuSO ₄	20
7.2.4 Velocidad de Crecimiento radial en caja de Petri en agar medio M17, rojo Congo y con CuSO ₄	21
7.5 Cultivo en liquido en medio M17 con rojo Congo sin y sin CuSO ₄	22
7.6 Lacasas	24
7.7 Degradación del colorante.....	25
7.8 Zimogramas	27
8.Discusión	28
9. Conclusiones	29
10. BIBLIOGRAFÍA	30
11. Anexo	35
Zimogramas	35

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentración de efluentes generados por diferentes industrias	1
Tabla 2. Taxonomía de <i>Trametes versicolor</i>	8
Tabla 3. Medios de cultivo comerciales utilizados para el crecimiento de <i>Trametes versicolor</i>	9

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Trametes versicolor</i>	8
Figura 2. Estructura química del colorante Rojo Congo	12
Figura 3. Inoculo de <i>Trametes versicolor</i> en agar Hit en cajas de Petri y frascos de gerber.....	18
Figura 4. Crecimiento del hongo <i>Trametes versicolor</i> en cajas Petri en medio HIT sin CuSO ₄ a diferentes concentraciones de rojo Cong.....	19
Figura 5. Crecimiento del hongo <i>Trametes versicolor</i> en cajas Petri en medio HIT con CuSO ₄ . a diferentes concentraciones de rojo Congo.....	20
Figura 6. Crecimiento del hongo <i>Trametes versicolor</i> en cajas Petri en medio M17 sin CuSO ₄ a diferentes concentraciones de rojo Congo.	21
Figura 7. Crecimiento del hongo <i>Trametes versicolor</i> en cajas Petri en medio M17 con CuSO ₄ a diferentes concentraciones de rojo Congo.	22
Figura 8. Cinética de biomasa del medio M17 adicionado con CuSO ₄	23
Figura 9. Cinética de producción de biomasa en el medio M17	24
Figura 10. Producción de lacasas en los medio M17, M24 y M17 con CuSO ₄	25
Figura 11. Degradación del colorante en el medio M17	¡Error! Marcador no definido.
Figura 12. Degradación del colorante medio M17 adicionado con CuSO ₄ ...	¡Error! Marcador no definido.
Figura 13. Degradación decolorante medio M24 conCuSO ₄ ..	¡Error! Marcador no definido.

Figura 14. Zimograma de lacasas pH 4.5 del medio M17	2727
Figura 15. Zimograma de lacasa pH 4.5 del medio M17 adicionado con CuSO ₄ .	28
Figura 16. Zimograma de lacasa pH 4.5 del medio M24 con CuSO ₄	28
Figura 17. Crecimiento en liquido de <i>Trametes versicolor</i> en los diferentes medios sin colorante	36
Figura 18. Crecimiento en liquido de <i>Trametes versicolor</i> en el medio M17 a las diferentes concentraciones del colorante	36
Figure 19. Crecimiento de <i>Trametes versicolor</i> en caja de Petri en el medio HIT	37
Figure 20. Crecimiento de <i>Trametes versicolor</i> en caja de Petri en el medio M17.....	37

Abreviaturas

mg/L: Miligramo por litro

CuSO₄: Sulfato de cobre

μL: Microlitros

ppm: Partes por millón

U/L: Unidad enzimática por litro

rpm: Revoluciones por minuto

g/L: Gramos por litro

DMP: 2,6-dimetoxifenol

ABTS: Ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico

HIT: Harina integral de trigo

PDA: Agar de papa dextrosa

M17: Medio 17

1. INTRODUCCION

1.1 Producción y consumo de colorantes en el mundo.

En el mundo más de 10,000 diferentes colorantes químicos y auxiliares de tintura son utilizados por la industria textil, se estima que la producción mundial es aproximadamente de 800,000 toneladas por año según Palmieri *et al.*, 2005. Más recientemente en el 2014 se estimó que la producción mundial anual de textiles oscila entre 60 y 70 millones de toneladas, requiriendo 9 mil millones de metros cúbicos de agua suficiente para llenar 3.6 millones de piscinas de tamaño olímpico (Delgado, 2017).

Los principales centros geográficos de producción de colorantes textiles se encuentran en Europa y Asia. No obstante, otros países como Brasil y México también los producen (Hunger, 2003). Más de 10,000 diferentes tipos de pigmentos y colorantes sintéticos son utilizados en las distintas industrias como la azucarera, cervecera, destilería, curtido, pulpa y textil, entre otras. Las actividades de estas industriales liberan grandes cantidades de aguas residuales contaminadas en M³/TN con colorantes en unidades Hazen o escala APHA, que se utiliza para evaluar muestras de aceites, derivados del petróleo, así como solventes, plásticos y productos farmacéuticos de evaluación visual basado en los colores de los patrones líquidos de la solución de platino-cobalto ver Tabla 1, columna 3 (Anjaneyulu *et al.*, 2005 y Días, *et al.*, 2007).

Tabla 1. Concentración de efluentes generados por diferentes industrias (Anjaneyulu *et al.*, 2005)

INDUSTRIA	CANTIDAD DE AGUA GENERADA (M ³ /TN)	CONCENTRACIÓN DE COLOR (UNIDADES HAZEN)
Azucarera	0.40	150-200
Cervecería	0.25	200-300
Destilería	12	200-300
Curtido	28	400-500
Pulpa y papel	175	100-600
Textil	120	1100-1300

Los efluentes de la industria textil se caracterizan por fluctuaciones extremas en parámetros, como: demanda química de oxígeno (DQO), demanda biológica de oxígeno (DBO), pH, color y salinidad, algunos de los parámetros característicos de estos efluentes son los siguientes (Kuhad *et al.*, 2004; Dos Santos *et al.*, 2007).

- Color visible (1100-4500 unidades)
- Demanda química de oxígeno (800-1600 mg/L)
- pH alcalino (9-11)
- Sólidos totales (6000-7000 mg/L)

1.2 Producción y consumo de colorantes en México

La industria textil es un sector significativo para la economía mexicana, tanto en términos de generación de empleo como de exportaciones, se ha logrado exportar hasta 4.695 millones de dólares, colocándose como el quinto proveedor a nivel mundial, siendo el tercer productor más importante del PIB. El 60% de las exportaciones totales textiles del país se destinan a Estados Unidos (EE. UU.), esta proporción es más alta en prendas de vestir (91.8%). El segundo mercado en importancia son el resto de los países del Continente Americano, donde se canaliza el 22% de las exportaciones mexicanas de este sector (Cohen, 2018).

La industria textil en México consta de alrededor de 20,000 empresas con un 10% del PIB en el sector manufacturero, el 90% de estas son PYMES que crean alrededor de un millón de empleos directos e indirectos (INEGI, 2020). Esta comprende fibras naturales y químicas, hilados y tejido, es intensiva en maquinaria y equipo, sin embargo, es una de las industrias que mayor consumo de agua tiene y genera productos xenobióticos de diferente naturaleza tóxica. Las aguas residuales que liberan las industrias textiles ponen en riesgo la salud del sistema biótico del mundo, ya que al ser liberadas al medio ambiente y no ser tratadas adecuadamente, llevan subproductos contaminantes de colorantes parcialmente degradados que con frecuencia son más tóxicos que los mismos colorantes. (Dwivedi y Singh, 2018). Un estudio de Greenpeace International, 2012, señaló que

las descargas textiles contienen los compuestos xenobióticos como Ninofenol (NP), Bencenos Triclorados, Fosfato de Tributilo, Ésteres de ftalatos (DEHP y DiBP), TMMD (Surfactante), Bencenos Triclorados, que son altamente contaminantes, así como agentes fijadores. Además, vinagre, bicarbonato de sodio, sales minerales como alumbre potásico, sulfato ferroso, sulfato de cobre, cloruro de estaño, diferentes ácidos, emulsificantes, dispersantes y colorantes. Los colorantes específicamente se diseñan para ser estables y altamente resistentes a factores ambientales, incluso a la degradación microbiana, por lo que son difíciles de eliminar en las plantas de tratamiento de agua convencionales (Martínez *et al.*, 2014).

1.3 Colorantes

En química, se nombra colorante a una sustancia que tiene la capacidad de absorción de distintas y concretas longitudes de onda dentro del espectro de la luz visible. Los colorantes se fijan a otro tipo de sustancias, otorgándoles una coloración estable, por lo que no suelen ser alteradas por factores como la luz, oxidantes, agua, entre otros (Méndez, 2013). En particular, la clasificación química de los colorantes orgánicos toma en cuenta su grupo cromóforo (por ejemplo, colorantes azo, antraquinonas, etc.). En aquellos que poseen más de un grupo cromóforo prevalece el más frecuentemente encontrado en los colorantes (Marcano, 2018).

1.4 Contaminación por colorantes.

Los colorantes tienen una fijación baja sobre las telas y alta en el líquido que se descargan, se pueden encontrar concentraciones de colorante superiores a 1,500 mg/L (Miranda, 2022). Debido a su estructura química, más del 90% de los colorantes persisten después de los tratamientos convencionales con lodos activados, resisten la exposición solar o el ataque químico y son recalcitrantes a la acción de depuración con dichos tratamientos (Días *et al.*, 2007). Se ha demostrado que ciertos colorantes azo pueden ser carcinogénicos y mutagénicos, además de que sus productos de degradación pueden resultar más tóxicos. Las aminas aromáticas que se generan de la ruptura del enlace azo son comúnmente conocidas

por su potencial carcinógeno (Chung *et al.*, 1992, Stevens, 1993; Weisburger, 2002). En la fauna acuática puede causar alteraciones en su desarrollo embrionario y en microalgas afecta el crecimiento poblacional (Jerónimo y Zamora, 2019)

1.5 Métodos para el tratamiento de aguas residuales con colorantes.

Los sistemas de tratamiento de aguas residuales constan de dos tipos de procesos los fisicoquímicos y los biológicos. Los primeros son costosos y requieren de gran cantidad de energía, reactivos y algunos no van dirigidos a degradar colorantes, se utilizan productos químicos para la alteración del estado físico del agua como: floculación, coagulación, adsorción en carbón activado, tecnologías de membrana, tratamientos con ozono o radiación solar. En el segundo caso, los procesos biológicos son una opción biotecnológica sustentable, económicamente viable y respetuoso con el medio ambiente, para el tratamiento de efluentes contaminados (Cortázar *et al.*, 2012, Dwivedi y Singh, 2018). Entre los métodos biológicos más utilizados están: la biosorción, la biodegradación aeróbica o anaeróbica y la producción de enzimas que catalizan la decoloración y degradación de los colorantes, ejemplo de estos organismos son: bacterias, algas y hongos (Cortázar *et al.*, 2012).

1.5.1. Tratamientos químicos.

En el grupo de procesos químicos implementados para el tratamiento de efluentes contaminados con colorantes, se presentan algunas técnicas de oxidación química como: los procesos de ozonación, fenton, ultrasonido, fotocátalisis (ultravioleta), oxidantes convencionales (peróxido de hidrógeno), procesos de coagulación/floculación y electrocoagulación, entre otras tecnologías. La remoción de colorantes utilizando sistemas de ozonización puede ser favorecida por las condiciones acidas del medio y el uso de iones metálicos como hierro y manganeso, entre otras variables, no obstante, al igual que en los procesos de adsorción, existe una gran contribución de la naturaleza del colorante (ácido, básico, reactivo, etc.) sobre el intervalo óptimo de operación de la tecnología. (Barrios-Ziolo *et al.*, 2015).

1.5.2 Tratamientos físicos.

La adsorción es uno de los métodos físicos más comunes para la remoción de colorantes, pero resulta ser una tecnología que se ve afectada por un gran número de factores, tales como: el área superficial del sorbete, el tamaño de partícula, el tipo de colorante, el pH y la temperatura, entre otros. Para seleccionar un adsorbente debe tener una alta afinidad, capacidad de adsorber compuestos diversos y presentar la posibilidad de regenerarse. El carbón activado ha resultado efectivo para remover colorantes catiónicos y ácidos, aunque la remoción es moderada para colorantes dispersos, reactivos y directos. Las características del agua residual, así como el tipo de colorante presente influye en la eficiencia de remoción. El carbón activado es relativamente costoso y hay pérdidas del 10 al 15% durante el proceso de activación, por lo cual debe ser regenerado (Cortázar, 2013)

1.5.3 Tratamientos biológicos.

Las tecnologías que permiten remover colorantes textiles del agua involucran diversas áreas de la ciencia como biología, biotecnología, microbiología y bioquímica, etc. Los tratamientos biológicos son métodos efectivos para aguas residuales con colorantes, no dañan el medio ambiente, tiene baja producción de lodos y bajos costos (Jiménez, 2009). En condiciones adecuadas, los organismos y/o sus enzimas pueden reducir una diversidad de sustancias químicas recalcitrantes (Barrios-Ziolo *et al.*, 2015). La actividad metabólica de los microorganismos puede ser optimizada con la adición de fuentes de carbono y nitrógeno, así como vitaminas y minerales las cuales pueden acelerar la asimilación del colorante. Los procesos biológicos implementados, evalúan la influencia de factores como: el modo de operación en matraz o en el reactor (batch, feedbatch o, Air-Lift), la temperatura del medio, el pH, agitación, la concentración inicial de colorante y la concentración de microorganismos, además de la presencia de oxígeno. Los tratamientos biológicos permiten obtener buenos porcentajes de remoción de color y carbono orgánico total (COT) de entre 80 y 100% en función de la secuencia de procesos aerobios o anaeróbicos usados, sin embargo,

se realizan a bajas velocidades lo que incrementa sustancialmente los tiempos de tratamiento. Estas técnicas han sido muy efectivas para el tratamiento de remoción de colorantes en aguas residuales, tienen ventajas, ya que estos procesos no dañan al medio ambiente y son poco costosos (Cortázar *et al.*, 2012). Uno de los organismos ampliamente utilizados son los hongos, siendo los de podredumbre blanca de la madera los más estudiados, entre ellos destacan *Phanerochaete chrysosporium* y *Pleurotus sajorcaju*, en cuanto a la remoción de colorantes, debido a que presentan la capacidad de degradar sustratos complejos a través de un sistema enzimático no específico.

2. ANTECEDENTES

2.1 Hongos de podredumbre blanca.

Los hongos de la podredumbre blanca (HPB), de la madera deben su nombre a la capacidad que presentan de crecer sobre material con alto contenido de celulosa como los troncos de los árboles. Son microorganismos eucarióticos, heterotróficos, saprófitos; cuya pared celular está compuesta por glucanos, quitina y glicoproteínas (Jiménez, 2009). Entre estos se encuentran *Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Corioloopsis gallica*, *Pleurotus sajorcaju*, y *Pleurotus ostreatus*, que son basidiomicetos, agaricales que se han utilizado en la degradación de compuestos recalcitrantes, mediante enzimas como la Lacasa, lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa, asociadas con la mineralización de la lignina (Cardona *et al.*, 2009). A dichas enzimas se les atribuye la capacidad de oxidar tanto los anillos aromáticos como algunos de los sustituyentes presentes en las unidades de este polímero (Barreto *et al.*, 2014).

2.2 Lacasas de hongos.

Las lacasas son los sistemas enzimáticos más antiguos y estudiados. son secretadas en el medio extracelular por varios hongos durante el metabolismo secundario, contienen 15 a 30% de carbohidratos y tienen una masa molecular de

60 a 90 kDa. La lacasa es una enzima versátil que catalizan reacciones de oxidación acopladas a la reducción de cuatro electrones de oxígeno molecular a agua de compuestos tóxicos y recalcitrantes. Se han aplicado a la nanobiotecnología, que es un campo de investigación en aumento y cataliza reacciones de transferencia de electrones sin cofactores adicionales. La nanobiotecnología, que es un campo de investigación en aumento y cataliza reacciones de transferencia de electrones sin cofactores adicionales.

El interés industrial en la Lacasa es debido a que puede romper los anillos fenólicos de la lignina para degradarla, un biopolímero fenólico que forma parte de la pared celular de las plantas, la usan como fuente de energía para su crecimiento, actúa a diferentes pH entre 3.5 a 7.5 y temperaturas que varían entre 25 a 60 °C (Shraddha *et al.*, 2011). Los anillos fenólicos se encuentran como estructura base de muchos colorantes, lo que los hace propicios para su degradación por la lacasa debido a su semejanza estructural con los productos liberados de la lignina y sobre compuestos no fenólicos relacionados con la lignina, así como contaminantes ambientales. Existen hongos basidiomicetos capaces de producir varios tipos de lacasas e isoformas entre ellos *Trametes versicolor*, dependiendo en el medio en que se cultive (Morales *et al.*, 2015). Recientemente se han desarrollado varias técnicas para la inmovilización de biomoléculas tales como micropatrones, monocapa auto ensambladas y técnica capa por capa que inmovilizan lacasa y preservan su actividad enzimática (Shraddha *et al.*, 2011).

2.3 *Trametes versicolor*.

Trametes versicolor, es uno de los hongos basidiomicetos más conocidos, apreciados y utilizados tanto en medicina tradicional como en prácticas clínicas modernas principalmente en países asiáticos (Figura 1). Este hongo se encuentra ampliamente distribuido en todo el mundo, generalmente crece sobre árboles débiles o muertos y troncos secos o quemados (Lara *et al.*, 2019, Legerská *et al.*, 2018; lark *et al.*, 2019; Saha y Mukhopadhyay, 2020).



Figura 1. *Trametes versicolor* (Gómez et al., 2019)

2.3.1 *Trametes versicolor* taxonomía y descripción

Trametes versicolor es un hongo de la podredumbre blanca, saprobio, basidiomiceto, lignícola ya que crece sobre madera de árboles como *Dracaena draco* (L.) L o drago y *Pinus caribaea* o pino caribe (Encinas & Mora 2003) desarrolla cuerpos fructíferos o setas (basidiomas) con sombreros imbricados, de 3 a 6 cm, delgados, de borde ondulado, que carecen de pie y se aplanan prontamente. La cara superior es aterciopelada, satinada, y presenta anillos concéntricos de varios colores, del pardo-negruzco al blanco, rosado, verde, azul, del marrón-rojizo al ocre, a veces con iridiscencias, dependiendo del grado de humedad presente en el ambiente (Gómez et al., 2019).

Tabla 2. Taxonomía de *Trametes versicolor*

Reino:	Fungí
División:	Basidiomycota
Clase:	Agaricomycetes
Subclase:	Agaricomycetidae
Orden:	Polyporales
Familia:	Polyporaceae
Género:	<i>Trametes</i>
Especie:	<i>Trametes versicolor</i>

Tabla 3. Medios de cultivo comerciales utilizados para el crecimiento de *Trametes versicolor*

Medios de cultivo

PDA
TRIGO
EMA
SABOURAUD

2.4 Aplicaciones

En el proceso de biorremediación, los contaminantes se biotransforman a su estado original, lo que no tiene efectos negativos sobre el medio ambiente. Por ejemplo, para la biorremediación de las aguas residuales de la industria alimentaria, se han utilizado lacasas. Este hongo y sus enzimas es conocido por degradar compuestos recalcitrantes incluyendo: los bifenilos policlorados, colorantes, hidrocarburos aromáticos y policíclicos. (Silva & Chamba, 2013). Stoilova y colaboradores en 2001, obtuvieron que la lacasa de *Trametes versicolor* que mostró ser activa en el rango de pH de 3.3 a 7.0, siendo más estable a pH 4.5, reteniendo más del 90% de su actividad entre 40 a 47 °C. La lacasa se utiliza en la industria alimentaria, la industria del papel y la pulpa, la industria textil.

2.5 Antecedentes directos

En el estudio realizado por Hernández 2019, en el cual se emplearon tres colorantes de la industria textil y utilizados en laboratorios que son azul de coomassie, azul de bromofenol y rojo Congo. La remoción de estos colorantes fue llevada a cabo por dos lacasas de *Coriolopsis gallica* (mutante y silvestre) expresadas en *Pichia pastoris* (levadura). Los experimentos se realizaron en medios de cultivos con

CuSO₄ como cofactor de la enzima, y metanol como fuente de carbono e inductor del vector α -fLcCg-pPICZB. Se utilizaron dos controles negativos *P. pastoris* con el vector vacío y sin el vector. Los colorantes se agregaron al 0.1%. En los resultados se observó una degradación del colorante azul de comassie de 2.47% por la lacasa silvestre y 19.4% por la lacasa mutante, con el azul de bromofenol fue de 6.8% por la lacasa silvestre y por la mutante fue de 7%, con rojo Congo fue de 13.2% lacasa silvestre y 14.3% lacasa mutante. Siendo el rojo Congo el colorante que se degradó en mayor porcentaje por la lacasa silvestre, por otro lado, la lacasa mutante degradó mejor al azul de comassie, seguido por el rojo Congo y finalmente el azul de Bromofenol.

Arıca y Bayramoglu en el 2007, estudiaron la degradación de dos colorantes a base de bencidina, azul directo 1 (DB-1) y rojo Congo (DR-128) en solución acuosa utilizando la biomasa *Trametes versicolor*. Se tomaron en cuenta diferentes parámetros, como el peso molecular del colorante, la dosis de adsorbente, el pH, temperatura y fuerza iónica. La biosorción para ambos colorantes fue a las 6 h a pH 6 para DB-1 y a pH 3.0 para DR-128. Se encontró que la capacidad de biosorción de la biomasa fue a una concentración de colorante de 800 mg/L a 01.1 y 152.3 mg para DB-1 y de 189.7 y 225.4 mg de colorante de biomasa para DR-128, respectivamente. Los modelos de isotermas de adsorción de Freundlich y Temkin se utilizaron para la descripción matemática del equilibrio de biosorción. Los modelos de Freundlich y Temkin pudieron describir el equilibrio de biosorción de DB-1 y DR-128 en las preparaciones fúngicas nativas y tratadas térmicamente. El modelo de Freundlich también mostró que el colorante rojo Congo DR-128 tenía una mayor afinidad de adsorción que el colorante DB-1. La biosorción de colorante en las preparaciones de biomasa fúngica siguió el modelo cinético de segundo orden. Lo que sugiere que posiblemente la biomasa fúngica de *Trametes versicolor* adsorba el colorante rojo Congo.

Forootanfar, 2012, reportaron la decoloración de seis colorantes sintéticos utilizando tres fuentes de lacasa fúngica de *Aspergillus oryzae*, *Trametes versicolor* y *Paraconiothyrium variabile* se utilizaron panseu-S 250 mg/L, azul de metileno 100

mg/L, rojo Congo 360 mg/L, azul de bromofenol 120 mg/L, azul brillante commassie 120 mg/L, azul brillante Remazol R 600 mg/L de colorante. Entre éstas lacasas, la enzima de *P. variabile* fue la más eficiente, decoloró azul de bromofenol (100%), azul brillante commassie (91%), panseu-S (56%), azul brillante Remazol R (RBBR; 47%), rojo Congo (18.5%) y azul de metileno (21.3%) después de 3h de incubación en presencia de hidroxibenzotriazol (HBT; 5 mM) como mediador de lacasa. También se observó que la eficacia de decoloración de todos los colorantes se mejoró aumentando la concentración de HBT de 0,1 mM a 5 mM. La lacasa de *A. oryzae* fue capaz de eliminar el 53% de azul de metileno y el 26% de RBBR después de 30 min de incubación en ausencia de HBT, pero la enzima no logro decolorar eficazmente otros colorantes, incluso en presencia de 5 mM de HBT. En el caso de la lacasa de *Trametes versicolor*, solo RBBR se decoloró (93%) en ausencia de HBT después de 3 h de incubación.

Selvam en el 2012, realizó un estudio donde se utilizó el hongo *Trametes versicolor* para la decoloración tres colorantes azoicos el naranja G (50 µM), el rojo Congo (50 µM), y negro amido 10B (25 µM). Los estudios por lotes se realizaron en un medio definido con pH-4.5. Cada colorante a diferentes concentraciones el naranja G, el rojo Congo y negro 10B de amido, se inocularon con suspensión de esporas de *Trametes versicolor* y se incubaron en un agitador rotatorio (120 rpm) a 39 °C durante 6 días. Después de 6 días, las muestras se extrajeron a intervalos de tiempo regulares y se filtraron a través de un filtro de vidrio sinterizado G3. Los resultados revelaron que el hongo pudo eliminar el 34.60 % del naranja G en la solución sintética, mientras que el 98.27 % y el 78.05 % eliminaron el rojo Congo y el negro amido 10B, respectivamente.

2.6 Rojo Congo

Rojo Congo, también conocido como Direct Red 128 (DR-128), es un colorante diazo-aniónico, también conocido como sal del ácido naftilensulfónico 3,3'-(4,4'-bifenilenbis (azo) bis (4, amino) disódico). Se prepara por una tetra diazotación con bencidina y ácido naftilsulfónico. Los enlaces covalentes en la molécula le confieren

estabilidad, que junto con la estructura molecular compleja dificultan la biodegradación y fotodegradación. Este colorante afecta la solubilidad de oxígeno en los cuerpos de agua y su transparencia, se ha reportado como altamente tóxico para los seres vivos por provocar carcinogénesis daños respiratorios, alergias y teratogénesis o problemas durante el embarazo. Puede ser metabolizado a bencidina conocida por ser carcinogénica. Aunque en la actualidad el rojo Congo está prohibido en alimentos por ser carcinogénico, existen efluentes que lo contienen y provienen de la industria del teñido de plásticos, técnicas analíticas de laboratorio (tejidos amiloides), imprentas (papel de libros y libretas) e industria textil, entre otras. Fig. 2 estructura del colorante rojo Congo (Martínez, 2012).

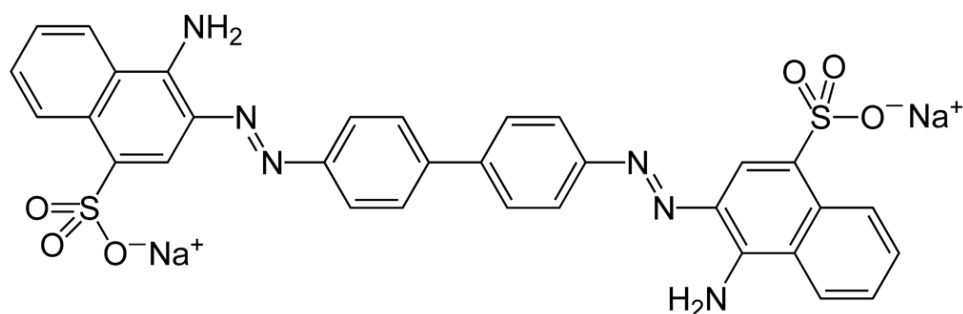


Figura 2. Estructura química del colorante Rojo Congo (Martínez, 2012)

3. JUSTIFICACIÓN

Los principales compuestos recalcitrantes o xenobióticos en el agua y con mayor impacto en el medio ambiente son los colorantes producidos por la industria textil, farmacéutica, cosméticas, y alimentos. Algunos de estos colorantes son tóxicos, cancerígenos, y de difícil degradación, causando problemas en los sistemas boticos. Para eliminarlos existen diferentes métodos químicos y físicos, pero algunos de estos métodos no suelen eliminar por completo los colorantes, son costosos y requieren de una cantidad de energía y reactivos elevada. Además, pueden generar subproductos de mayor toxicidad que el colorante original. En los

últimos años se han utilizado métodos biológicos con resultados positivos en comparación a los métodos fisicoquímicos convencionales. Entre los métodos biológicos se encuentra el uso de organismos como los hongos de la podredumbre blanca de la madera por su alta eficacia de degradar lignina. En este contexto el hongo *Trametes versicolor* posee lacasas que se han usado para la degradación de colorantes como: naranja G, tropaeolin O, azul reactivo 15 y negro reactivo 5 y rojo Congo. El rango de concentraciones de rojo Congo degradado por lacasas en estos tratamientos esta 0.25 a 60 ppm, las cuales son bajas ya que se considera toxico desde 100 ppm. Es por ello por lo que en este trabajo se determinara la capacidad del hongo *Trametes versicolor* para degradar concentraciones mayores de 100 ppm, para usarlo como potencial agente biológico para la degradación del colorante rojo Congo en procesos de tratamiento de aguas contaminadas por colorantes.

4. HIPÓTESIS

Las lacasas de *Trametes versicolor* son enzimas que pueden degradar el colorante rojo Congo a concentraciones arriba de 100 ppm en medios no comerciales.

5. OBJETIVO GENERAL

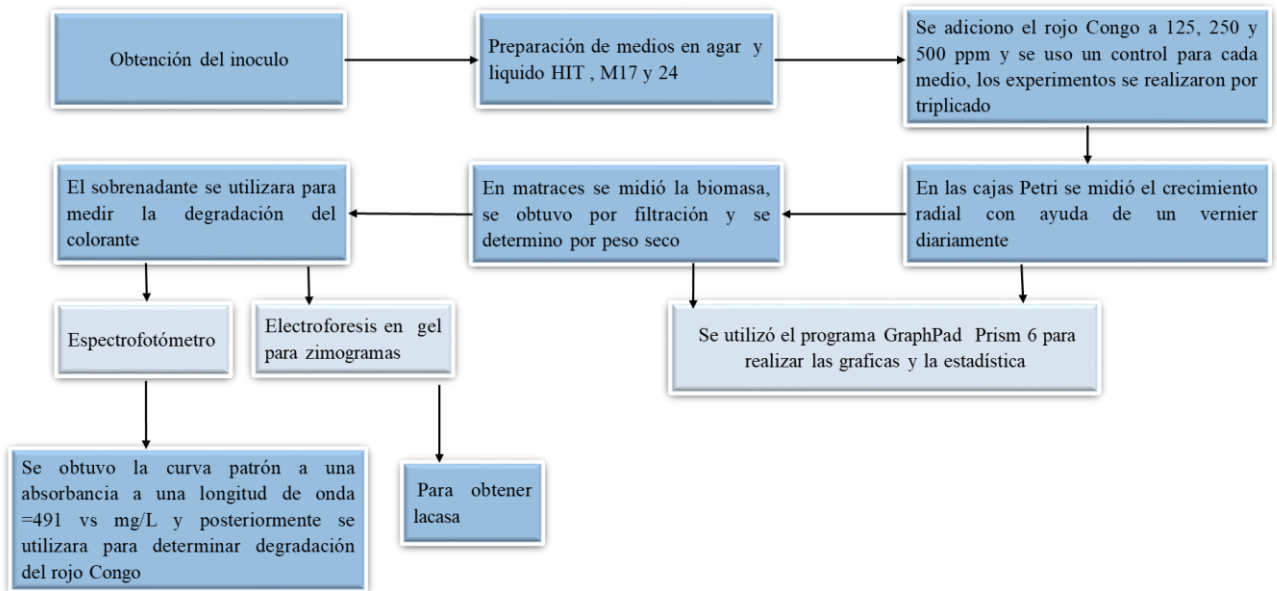
Determinar la capacidad de degradación del hongo *Trametes versicolor* sobre el colorante rojo Congo a concentraciones de 125, 250 y 500 ppm en cultivo en agar y en líquido.

5.1. OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Obtención de inóculos de *Trametes versicolor* a partir del Agar de harina integral de trigo (HIT).
2. Determinar la velocidad de crecimiento radial del hongo *Trametes. versicolor* en Agar HIT y M17 con y sin CuSO₄ a concentraciones de 125, 250 y 500 ppm de rojo Congo.
3. Determinar crecimiento en medio líquido M17 con y sin CuSO₄, además de medio 24 con CuSO₄ a concentraciones de 125, 250 y 500 ppm de rojo Congo.
4. Realizar zimogramas para determinar presencias de lacasas.
5. Determinar la degradación del colorante a las diferentes concentraciones: 125, 250 y 500 ppm de rojo Congo en medio líquido M17 con y sin CuSO₄

6. METODOLOGÍA

A continuación, se presenta un diagrama de actividades



13

6.1 Material biológico

La Cepa de *Trametes versicolor* LEFIP 1 se encuentra depositada en el cepario del laboratorio de LEFIP, CEIB UAEM, se adquirió de la Colección Universidad de Pennsylvania, USA.

6.2 Obtención del inóculo

Para la obtención de los inóculos fúngicos se utilizó la cepa de *Trametes versicolor* LEFIP 1, se cultivó en agar HIT en una caja de Petri durante 7 días en oscuridad a 29 °C y se mantuvo semanalmente hasta el final de este trabajo. Una vez que colonizó por completo la caja de Petri, se utilizó el horador de 1 cm para obtener el inóculo de la periferia del crecimiento micelial y sembrar en los respectivos medios.

6.3 Cultivo en agar con el medio HIT Y M17

A partir del inóculo previo de *Trametes versicolor*, se obtuvieron círculos de 1 cm con un horador, estos se sembraron en cajas de Petri en medio HIT y 17, de

manera independiente sin CuSO₄ y con CuSO₄ (0.1g/L), adicionados con 125, 250 y 500 ppm de rojo Congo y un control sin colorante cada experimento se realizó por triplicado.

6.3.1 Composición del medio HIT

Se utilizaron: 16 g/L de agar bacteriológico, 15 g/L de azúcar y 30 g/L de harina integral, el medio con cobre se le adiciono 0.1 g/L CuSO₄ a un pH 6.5. Cada uno de los medios se esterilizaron en la autoclave por 20 min a 121 °C.

6.3.2 Composición del medio M17

El medio M17 está en proceso de patentamiento, por lo que no se describe puntualmente, se puede mencionar que está constituido a base de agar bacteriológico glucosa, levadura y sales de fosfato. Posteriormente los medios de cultivo se vaciaron en las cajas de Petri en la campana y cuando solidificaron, se sembró el hongo. Las cajas inoculadas se incubaron a 29 °C, diariamente se midió crecimiento radial hasta colonizar las cajas Petri por completo.

6.4 Medios de cultivo en líquido M17 y M24

Se utilizaron tres diferentes medios de cultivo M17, uno sin y otro con CuSO₄ y el medio M24 con CuSO₄ en matraces Erlenmeyer de 500 ml con 300 ml de medio. Cada uno de los medios se esterilizo en la autoclave por 20 min a 121 °C.

6.4.1 Medio M24

Se utilizaron 12 g/L de glucosa y 15 g/L de levadura, al medio con CuSO₄ se le agrego 1 g/L CuSO₄. Se utilizó un control sin colorante diferentes concentraciones de Rojo control, 125, 250 y 500 ppm cada uno por triplicado en matraces Erlenmeyer

6.4.2 Cultivo en los Medios M17 y M24

Se llevaron a cabo dos diferentes medios de cultivo uno sin CuSO₄ y otro con CuSO₄ cada uno fue realizado en Erlenmeyer de 500 ml con 300 ml. El medio M17 y 24, está en proceso de patentamiento, y está constituido a base de agar bacteriológico, de glucosa y levadura. Se agitaron a 120 rpm (16-24 °C), (Cuevas, 2017)

6.5 Medición de biomasa húmeda y seca de cultivo en matraz

Los medios líquidos se cultivaron durante un mes y posteriormente, se filtraron con un papel filtro Whatman No. 2 de 5 cm de diámetro, previamente pesado, en un embudo sobre otro matraz mediante gravedad. La biomasa filtrada se colocó en una estufa a 40°C para su secado, el sobrenadante se colocó en tubos falcón de 50 ml, se almaceno a -80°C para posterior su uso. El peso de la biomasa seca en g/L, se obtuvo por diferencia de peso usando la siguiente formula:

$$\text{Peso papel filtro} - \text{peso de papel filtro con biomasa seca} = \frac{\text{diferencia de peso (g)}}{\text{peso (g)}} \times \frac{1000 \text{ ml}}{300 \text{ ml}} = \frac{\text{biomasa}}{\text{g/l}}$$

6.6 Medición de actividad de lacasas

La actividad enzimática de lacasa se determinó en los extractos crudos midiendo el cambio de absorbancia a una longitud de onda de 468 nm, usando como sustrato 2,6-dimetoxifenol (2,6-DMP) a una concentración de 2 mM en buffer de acetatos a pH 4.5, incubados a 40°C (Telléz -Telléz *et al.*, 2005).

6.7. Determinación espectrofotométrica de concentración de Rojo Congo

Para obtener la curva estándar y determinar la degradación de rojo Congo se empleó un espectrofotómetro SPECTRAMax PLUS 384, de la marca Molecular Devices. Primero se trazó la curva estándar de concentración de colorante en ppm vs. absorbancia a 491 nm, en placas de Elisa con 200 µL de muestra por pozo para determinar hasta que concentración se tiene una línea recta y cuando se satura. Las concentraciones utilizadas de rojo Congo fueron 62.5, 93.75, 125, 250 y 500 ppm, se determinó probar concentraciones más bajas que las mencionadas inicialmente en el trabajo, se realizó otra curva estándar ahora. El resultado de la absorbancia de las muestras de los extractos de cada cultivo se transforma a concentración de rojo Congo en ppm usando dicha curva estándar, utilizan la parte lineal de la curva.

6.8 Zimogramas

Se llevaron a cabo mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 10%, utilizando SDS en los buffers. Se cargaron 13 μL de muestra y 5 μL de buffer de carga por pozo. El gel se corrió a 100 V durante 50 min. un buffer pH 4.5 incubados a 40°C (véase en el anexo).

6.9 Análisis estadísticos

El error estadístico, porcentaje de degradación y cinética de crecimiento se procesaron en el software GraphPad

7. Resultados

7.1 Obtención de los inóculos

Trametes versicolor es un hongo que crece bien en agar HIT en cajas de 8 cm con 25 ml de agar HIT a 37 °C, con micelio abundante y algodonoso de color blanco. Se mantiene libre de contaminaciones hasta dos meses a 15 °C



Figura 3. Inoculo de *Trametes versicolor* en agar Hit en cajas de Petri y en la colección de hongos en frascos de gerber.

7.2 Cultivo en agares HIT y 17 con 125, 250 y 500 ppm

Debido a que *Trametes versicolor* a concentraciones arriba de 2000 y 2500 ppm, presento problemas de crecimiento y debido a que la detección del colorante en el espectrofotómetro a concentraciones arriba de 500 ppm se sale de la recta, se

decidió realizar de nuevo los experimentos, pero ahora a concentraciones más baja. Se usaron cajas de Petri de vidrio de 9 cm de diámetro para el cultivo del hongo en agar.

7.2.1. Velocidad de Crecimiento radial en caja de Petri en agar HIT con rojo Congo y con CuSO_4

En el control agar HIT sin CuSO_4 y rojo Congo, el micelio colonizó la caja de Petri por completo al día cinco con una velocidad de crecimiento radial de 0.9 cm/día. A concentraciones de 125, 250 y 500 ppm colonizó la caja de Petri al día seis, con una velocidad de crecimiento de 0.75 cm/día (Figura 4).

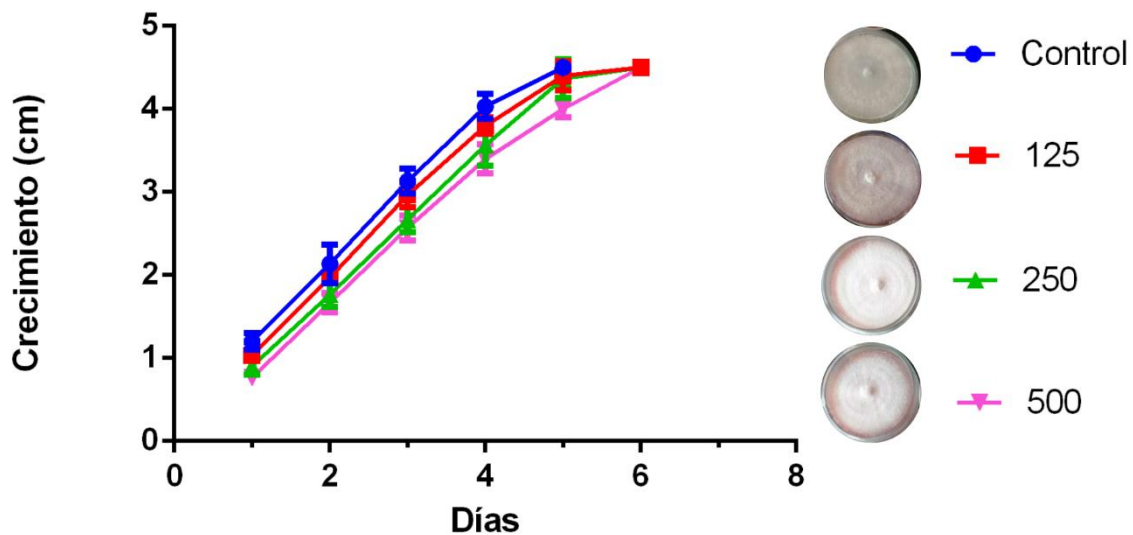


Figura 4. Crecimiento del hongo *Trametes versicolor* en cajas Petri en medio HIT sin CuSO_4 a diferentes concentraciones de rojo Congo.

7.2.2 Velocidad de Crecimiento radial en caja de Petri en agar HIT con rojo Congo y CuSO_4

En agar HIT el control con CuSO_4 y sin rojo Congo, el micelio cubre la caja de Petri en cinco días a una velocidad radial de crecimiento de 0.9 cm/día, a 125 y 250 ppm colonizaron la caja Petri al día seis con una velocidad de crecimiento radial de 0.75 cm/día y 500 ppm colonizo la caja Petri al día siete, con una velocidad de crecimiento de 0.64 cm/día (Figura 5).

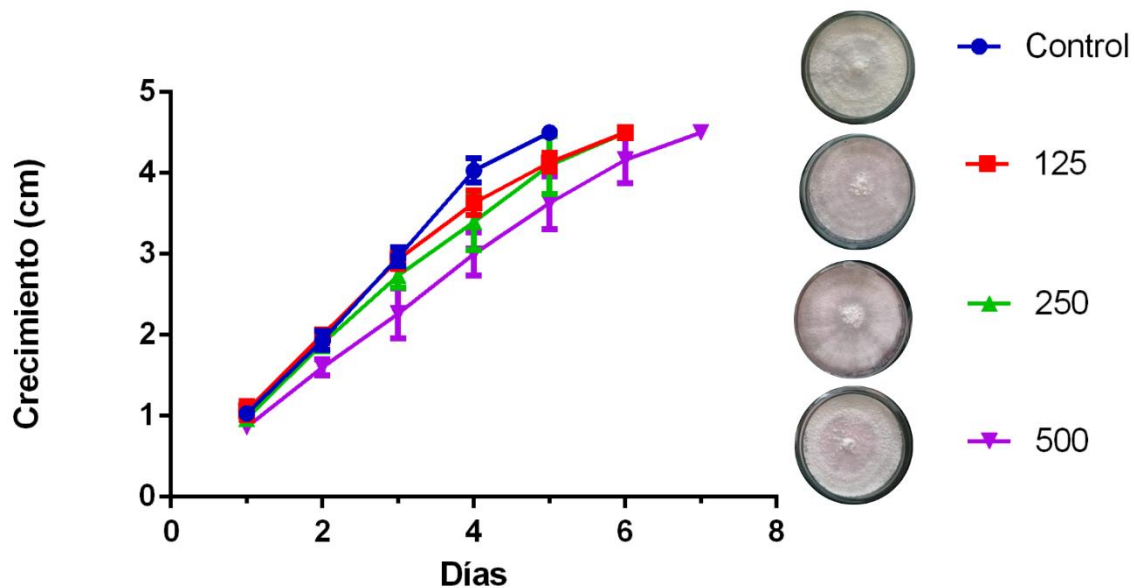


Figura 5. Crecimiento del hongo *Trametes versicolor* en cajas Petri en medio HIT con CuSO₄ a diferentes concentraciones de rojo Congo.

7.2.3 Velocidad de Crecimiento radial en caja de Petri en agar medio M17 con rojo Congo sin CuSO₄

En el control agar medio M17 es decir sin CuSO₄ y rojo Congo, el micelio colonizó la caja de Petri por completo al día siete con una velocidad de crecimiento radial de 0.64 cm/día, 125 ppm colonizó la caja Petri igual que el control. A concentraciones de 250 y 500 ppm colonizó la caja de Petri al día ocho, con una velocidad de crecimiento de 0.56 cm/día (Figura 6).

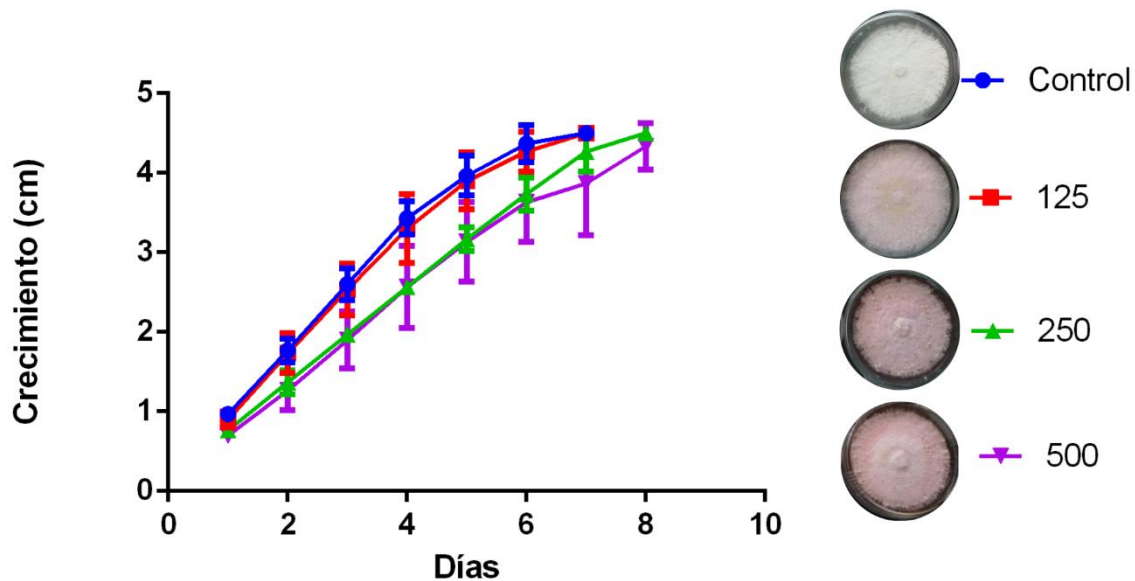


Figura 6. Crecimiento del hongo *Trametes versicolor* en cajas Petri en medio M17 sin CuSO_4 a diferentes concentraciones de rojo Congo.

7.2.4 Velocidad de Crecimiento radial en caja de Petri en agar medio M17, rojo Congo y con CuSO_4

En el control agar 17 con CuSO_4 y sin rojo Congo, el micelio cubre la caja de Petri en seis días a una velocidad radial de crecimiento de 0.75 cm/día, 125 ppm colonizo la caja igual que el control al día seis. Con 250 ppm de rojo Congo, el micelio colonizó la caja de Petri al día siete, con una velocidad de crecimiento radial de 0.64 cm/día y 500 ppm colonizo la caja Petri al día ocho, con una velocidad de crecimiento de 0.56 cm/día (Figura 9).

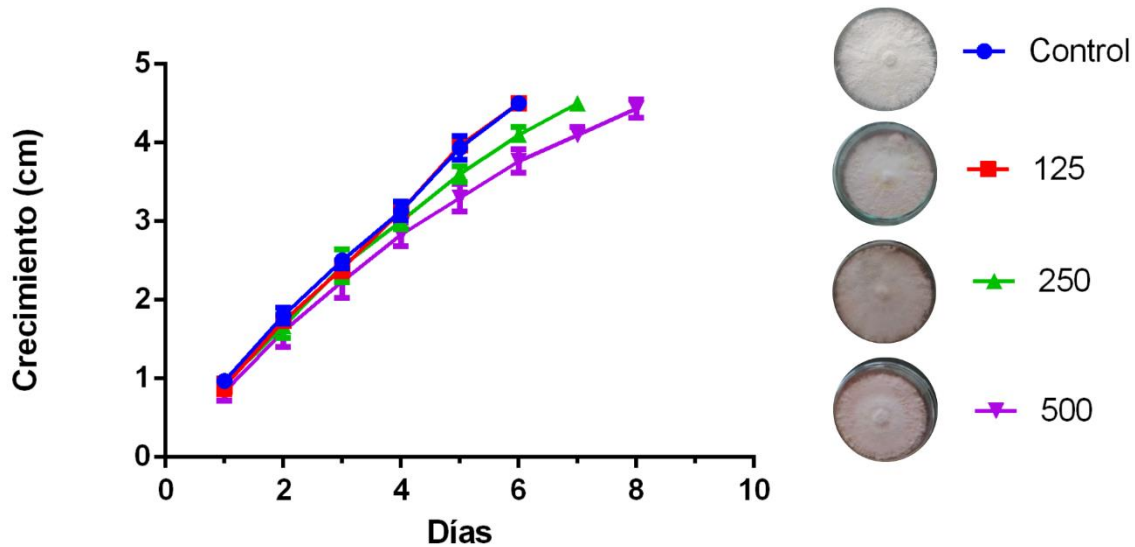


Figura 7. Crecimiento del hongo *Trametes versicolor* en cajas Petri en medio M17 con CuSO_4 a diferentes concentraciones de rojo Congo.

7.5 Cultivo en liquido en medio M17 con rojo Congo sin y sin CuSO_4

En la figura 10 se observa la producción de biomasa, se comenzó a medir a partir del día 4, posteriormente se sacaron los matraces cada 2 días hasta el día 16, Como se puede observar el control produjo más biomasa excepto en los días 8 y 10 donde la mayor producción de biomasa se obtuvo 125 ppm de rojo Congo, el mayor incremento fue al día 8. Se realizó la prueba de Tukey donde su obtuvo el valor de $P=0.4973$ esto quiere decir que no hay diferencias significativas entre la producción de biomasa.

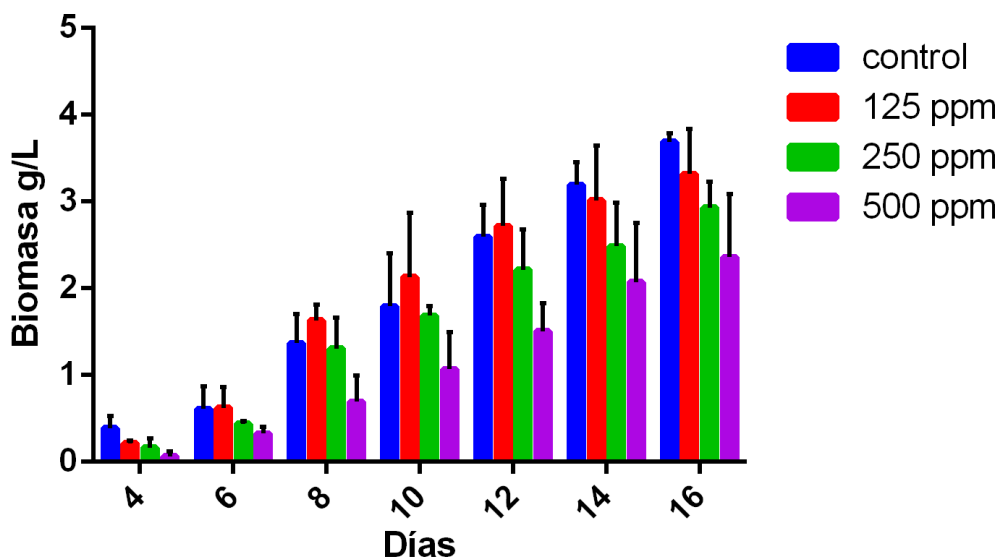


Figura 8. Cinética de biomasa del medio M17 adicionado con CuSO_4 .

El control en ausencia de rojo Congo tuvo mayor producción de biomasa en comparación con el medio de cultivo a una concentración de rojo Congo de 500 ppm, al día 4 no se presentó el menor crecimiento, es decir dicha concentración resulto ser inhibitoria. El crecimiento al día 4 fue similar en el control, a 125 ppm y a 250 y 500 ppm del colorante en los días posteriores fue más bajo en comparación con el control y la concentración de 125 ppm. En general el control obtuvo un crecimiento mucho mayor que las concentraciones del colorante de 125, 250 y 500 ppm excepto para los días 8 y 10 donde la concentración de 125 ppm obtuvo mayor crecimiento que el control. Al día 12, 14 y 16 hubo mayor producción de biomasa fue en el control seguido de 125, 250 y 500 ppm, figura 10.

En la figura 11, se muestra el crecimiento del hongo en medio M17 sin CuSO_4 , se observa claramente que el mayor crecimiento es en el control y que el efecto del cobre y de la presencia de rojo Congo disminuye la producción de biomasa a medida que aumenta la concentración de rojo Congo. Además, para esclarecer este efecto en comparación con los resultados obtenidos en medio M17 sin la presencia de CuSO_4 se realizó la prueba estadística de Tukey donde su obtuvo el valor de

P=0.3749 esto quiere decir que no hay diferencias significativas entre los tratamientos.

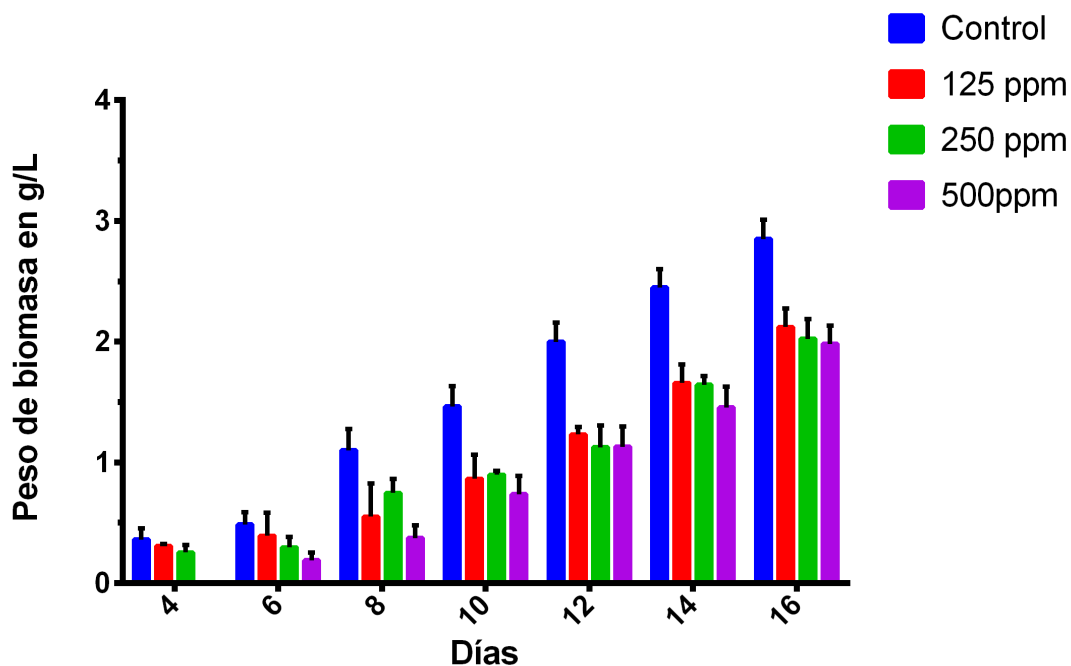


Figura 9. Cinética de producción de biomasa en el medio M17

7.6 Lacasas

En la figura 12, se observa que el mejor medio para la producción de lacasas fue el medio M24 con CuSO_4 alcanzando una mayor producción de lacasas de alrededor de 50,000 U/L al día 8, en comparación con el medio 17 con sulfato de CuSO_4 , donde alcanzó su máximo de actividad de lacasas al día 10 de alrededor de 20,000 U/L y en el medio M17 la producción fue la más baja de 10,000 U/L en comparación con las otras condiciones. Se realizó la prueba de Tukey donde se obtuvo el valor de $P=0.0097$ resultado que sugiere que los medios que tuvieron una diferencia significativa fueron el M24 y el M17 con cobre.

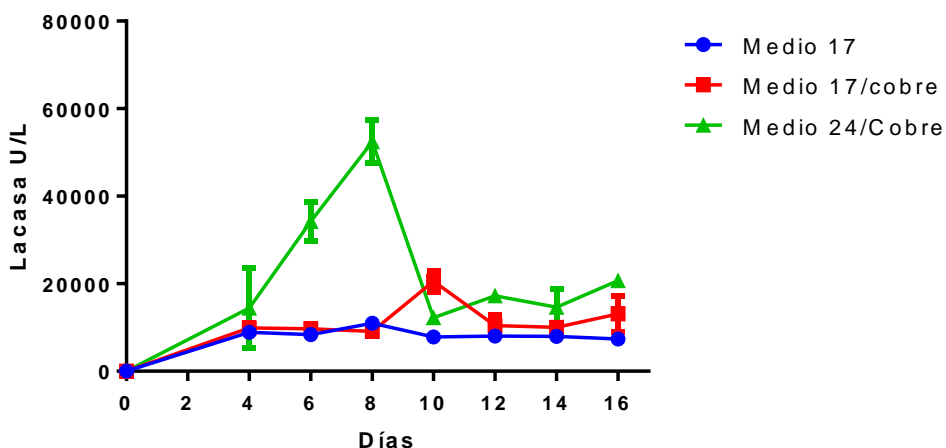


Figura 10. Producción de lacasas en los medio M17, M24 y M17 con CuSO_4

7.7 Degradación del colorante

En el medio M17 con 125 ppm de rojo Congo, se alcanzó una degradación de un 90% del colorante al día 16, seguida por un 44% de degradación para la concentración de 250 ppm en el mismo día y finalmente un 6% para la concentración 500 ppm al mismo día (figura 13). En el medio M17 con CuSO_4 , al día 17 se obtuvo una degradación de un 70% en 125 ppm, un 62% en 250 ppm y un 48% en 500 ppm (figura 14). En el medio 24 con CuSO_4 , al día 16 se degradó un 85% para 125 ppm, un 86% para 250 ppm y un 77% para 500 ppm (figura 15). Se realizó la prueba de Tukey donde se obtuvo el valor de $P < 0.0001$ esto indica que si hay diferencias significativas en la degradación del colorante a las diferentes concentraciones de rojo Congo de este para el medio M17, el medio M17 con sulfato de cobre el valor de $P = 0.0164$ donde los que tuvieron diferencias significativa fueron las concentraciones de 125 con 500 ppm y 250 con 500 ppm respectivamente, para el medio M24 el valor de $P = 0.0006$ donde las concentraciones que tuvieron diferencias significativa fueron las concentraciones de 125 con 500 ppm y 250 con 500 ppm respectivamente, Es decir que a concentraciones más bajas se observó una degradación mayor del colorante que a concentraciones arriba de 250 ppm.

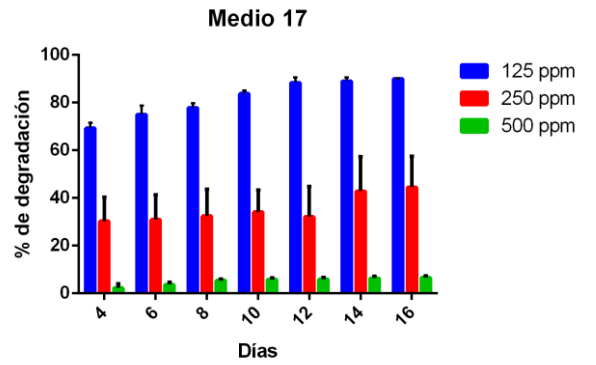
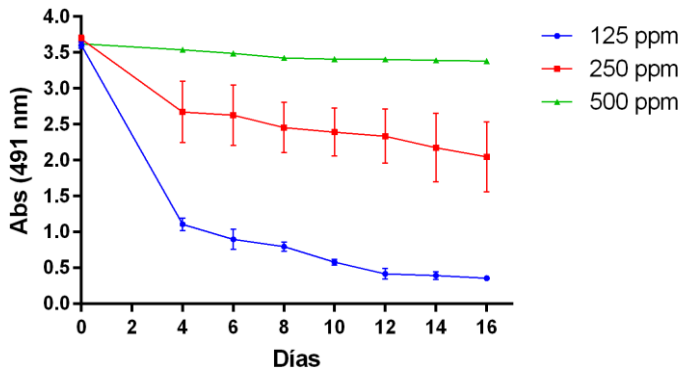


Figura 11. Degradación del colorante en el medio M17

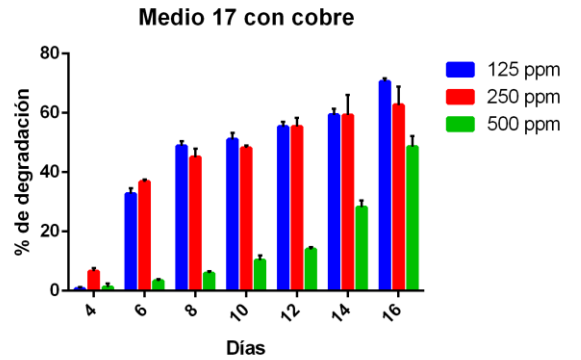
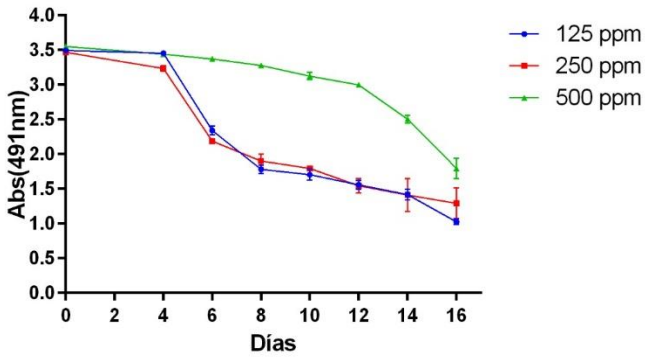


Figura 12. Degradación del colorante medio M17 adicionado con CuSO₄

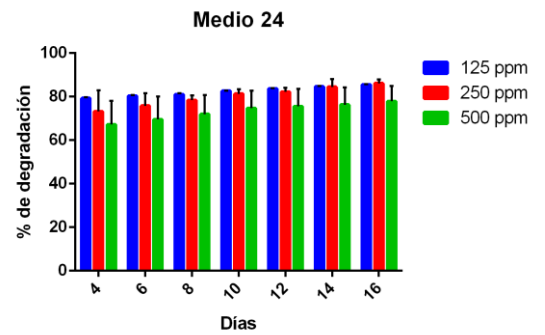
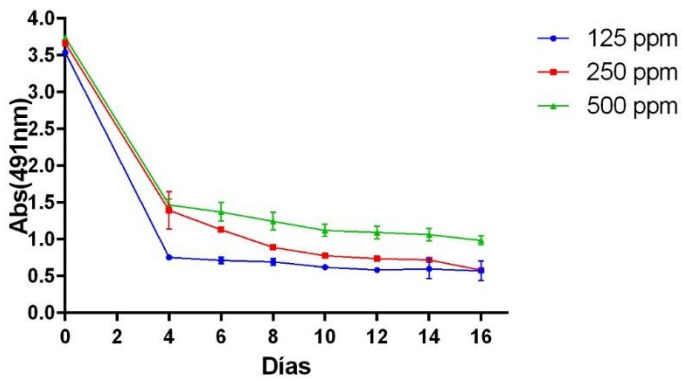


Figura 13. Degradación decolorante medio M24 con CuSO₄

7.8 Zimogramas

Se muestra el patrón de zimografía de los medios M17, M17 con CuSO₄ y M24 con CuSO₄ evaluados a pH 4.5. En el medio M17 se observó 1 banda con actividad de lacasa reveladas con 2,6 DMP obtenidas en los sobrenadantes obtenidos en los días 4 y 8, siendo la más intensa la del día 4 (figura 16). En el medio M17 adicionado con CuSO₄ se observó 1 banda en las muestras de los sobrenadantes de los días 4, 6, y 8, nuevamente siendo más intensa la del día 4 (figura 17). En el medio M24 con CuSO₄ figura 18 se observó 1 banda al día 4 y al día 10 dos bandas siendo una más intensa que la otra. En el día 16 también se observaron 2 bandas mucho más tenues que en los otros días. El peso de las lacasas es de aproximadamente 55-60 kDa. En los zimogramas de los extractos de algunos días no presentan bandas lo que puede deberse a que las muestras se concentraron suficientemente o en realidad no presentan actividad de lacasa a dicho pH,

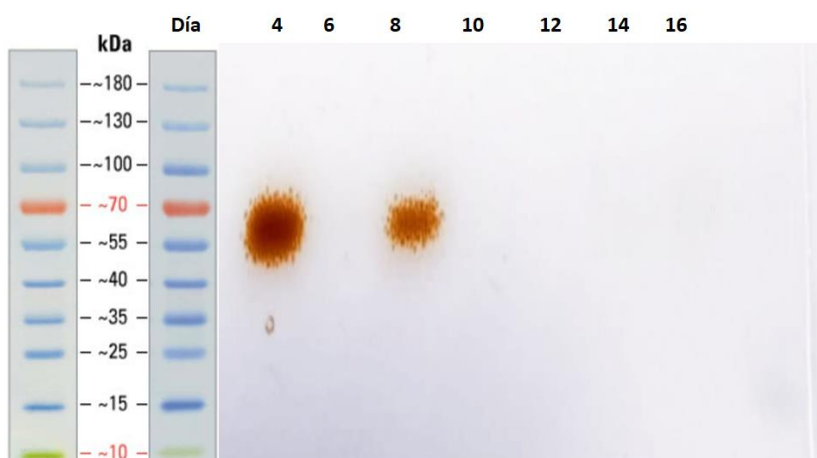


Figura14. Zimograma de lacasas pH 4.5 del medio M17

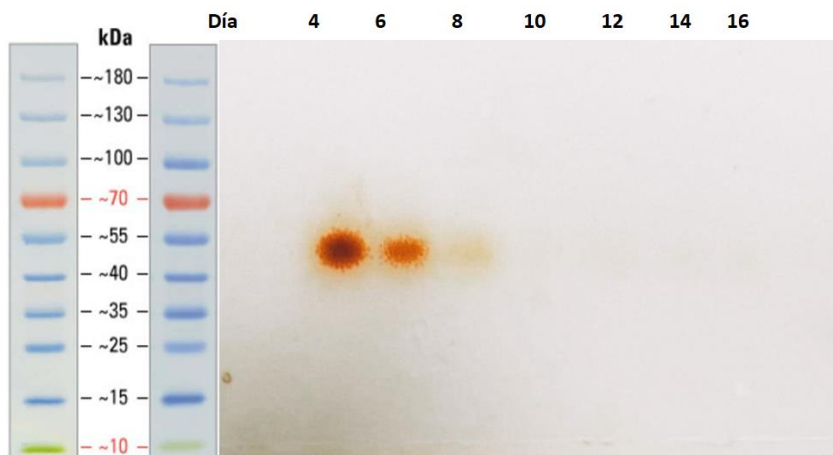


Figura15. Zimograma de lacasa pH 4.5 del medio M17 adicionado con CuSO_4

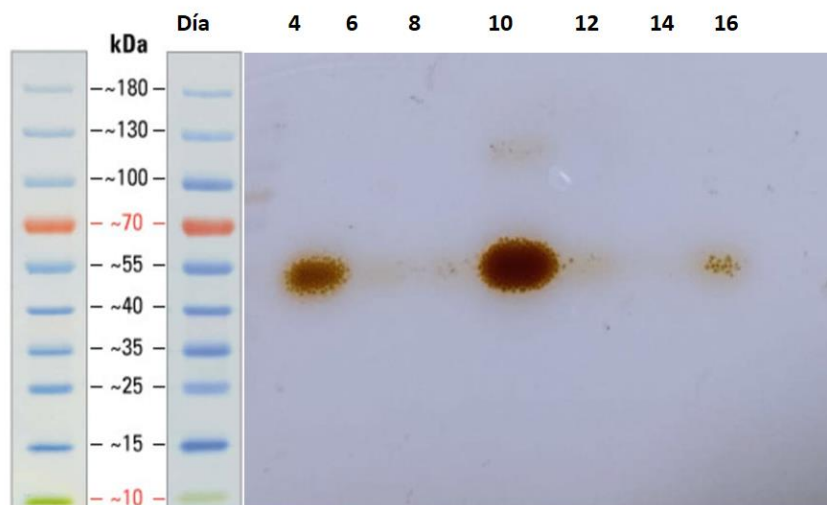


Figura16. Zimograma de lacasa pH 4.5 del medio M24 con CuSO_4

8. Discusión

La mayor velocidad de crecimiento radial de *Trametes versicolor* fue en agar medio HIT sin cobre. Este medio también fue reportado por Urdapilleta *et al.*, 2011 como el mejor para el crecimiento de dos cepas de *Trametes versicolor* una cepa nativa del estado de Morelos (HEMIM-9) y una cepa comercial procedente de Estados

Unidos (HEMIM-60), en dicho trabajo se utilizaron medios como: EMA, HIT Y PDA siendo el medio HIT el mejor porque se obtuvo un crecimiento más rápido para ambas cepas, lo que concuerda con los resultados de éste trabajo.

En el cultivo líquido se observó la biosorción del colorante rojo Congo en la biomasa este resultado concuerda con lo reportado por Bayramoğlu *et al.*, 2007 quienes utilizando la biomasa de *Trametes versicolor* y lograron la eliminación de los colorantes azul directo y rojo Congo los colorantes se utilizaron a una concentración de 800 mg/L, sin embargo, en este trabajo no se determinó el colorante rojo Congo bioadsorbido en la biomasa

9. Conclusiones

- El mejor medio en agar de los cuatro utilizados para el crecimiento en solido de *Trametes versicolor* fue el medio HIT sin cobre. En agar en caja de Petri de los cuatro medios utilizados se pudo observar que con forme aumentaba la concentración del colorante rojo Congo el crecimiento del hongo se volvió más lento. Lo que sugiere que el sulfato de cobre tiene un efecto benéfico y permite a *Trametes versicolor* crecer mejor en medio M17.
- De los 3 medios utilizados para cultivo liquido el mejor para la producción de biomasa fue el medio 17 adicionado con sulfato de cobre, donde se obtuvo mayor porcentaje de degradación el máximo de 80% fue en el medio M24 con CuSO_4 , este también obtuvo mayor producción de lacasas

10. BIBLIOGRAFÍA

- Anjaneyulu Y., Sreedhara-Chary N. y Suman-Raj S., 2005. Decolourization of industrial effluents – available methods and emerging technologies – a review. *Rev. Environ. Sci. Technol.*, 4, 245–273. <https://doi.org/10.1007/s11157-005-1246-z>.
- Bae S.J., Freeman S.H. y Kim D.S., 2006. Influences of new azo dyes to the aquatic ecosystem. *Fiber Polymer.*, 7, 30-35
- Barajas, A. D. J. A. (2015). Aplicación de lacasas producidas por hongos para degradación de colorantes microbiológicos (hematoxilina y azul de metileno). URI: <http://repositorio.ugto.mx/handle/20.500.12059/2530>.
- Barrios-Ziolo, L. F., Gaviria-Restrepo, L. F., Agudelo, E. A., & Cardona-Gallo, S. A. (2015). Technologies for the removal of dyes and pigments present in wastewater. A review. *Dyna*, 82(191), 118-126. DOI: <https://doi.org/10.15446/dyna.v82n191.42924>.
- Bayramoğlu, G., & Yakup Arıca, M. (2007). Biosorption of benzidine based textile dyes “Direct Blue 1 and Direct Red 128” using native and heat-treated biomass of *versicolor*. *Journal of Hazardous Materials*, 143(1-2), 135–143. doi: [10.1016/j.jhazmat.2006.09.002](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.09.002).
-
- Bertrand, B., Martínez-Morales, F., Tinoco-Valencia, R., Rojas, S., Acosta-Urdapilleta, L., & Trejo-Hernández, M. R. (2015). Biochemical and molecular characterization of laccase isoforms produced by the white-rot fungus *Trametes versicolor* under submerged culture conditions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 122, 339–347. doi: [10.1016/j.molcatb.2015.10.009](https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.10.009)
- Chung K.T., Steven S.E.J. y Cerniglia C. E., 1992. The reduction of azo dyes by the intestinal microflora. *Crit. Rev. Microbiol.*, 18, 175-197 DOI: [10.3109 / 10408419209114557](https://doi.org/10.3109/10408419209114557).
- Cardona, M., Osorio, J., & Quintero, J. (2009). Degradación de colorantes industriales con hongos ligninolíticos. *Revista Facultad de Ingeniería*

- Cortazar, A., González C., Coronel C, Escalante C., Castro J., Villagómez J. (2012) Biotecnología aplicada a la degradación de colorantes de la industria textil. Universidad y ciencia Vol.28 No.2 pp. 187-199.
- Cuevas Reyes Elizabeth. 2017. Optimización del medio de cultivo de *Pycnoporus cinnabarinus* HEMIM-53 para la producción de metabolitos de interés biotecnológico. Tesis de maestría en biotecnología, CEIB UAEM biblioteca de la UAEM
- Delgado Flores, M. J. (2017). Teñido artesanal de textiles usando colorantes de origen vegetal (Bachelor's thesis, Quito)
- Dos Santos, A. B., Cervantes, F. J., & van Lier, J. B. (2007). Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: perspectives for anaerobic biotechnology. *Bioresource technology*, 98(12), 2369–2385. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.11.013>
- Dwivedi, P., Singh T. (2018) Bioremediation of textile effluent for degradation and decolourization of synthetic dyes: a review. India, *International Journal of Current Research in Life Sciences* Vol. 07, No. 04, pp.1948-1951. <http://www.journalijcrls.com/sites/default/files/issues-pdf/01223.pdf>
- Dias A.D., Sampaio A. y Bezerra R.M., 2007. Environmental applications of fungal and plant systems: decolourisation of textile wastewater and related dyestuffs. *Environmental Bioremediation Technologies* (Editores Singh S.N. y Tripathi R.D.) Springer Berlin Heidelberg, 445-463. https://doi.org/10.1007/978-3-540-34793-4_19
- Encinas, O., & Mora, N. (2003). Patrones de degradación de las maderas de Pino caribe, Curarire y Drago por *Gloeophyllum trabeum*, *Trametes versicolor* y *Pycnoporus sanguineus*. *Revista forestal venezolana*, 47(1), 1-14.
- Forootanfar, H., Moezzi, A., Aghaie-Khozani, M., Mahmoudjanlou, Y., Ameri, A., Niknejad, F. y Faramarzi, MA (2012). Decoloración del tinte sintético por tres fuentes de lacasa fúngica. *Revista iraní de ciencias e ingeniería de la salud ambiental*, 9 (1), 1-10. DOI <https://doi.org/10.1186/1735-2746-9-27>

- Garzón, R. (2009) cinética de degradación de colorantes textiles de diferentes clases químicas por hongos y bacterias inmovilizados sobre fibra de Agave tequilana Webber var. Tesis de licenciatura, Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá Colombia.
- GREENPEACE INTERNATIONAL, 2012, Hilos tóxicos: al desnudo. Exponiendo el papel de la industria textil en la contaminación de los ríos de México, Ámsterdam, Greenpeace International, 31 págs.
- HERNANDEZ, A. E. A. (2019). Degradación de colorantes industriales (azul de coomassie, azul de bromofenol y rojo congo), mediante una cepa transgénica de pichia pastoris que expresa la lacasa de coriolopsis gallica. <http://riaa.uaem.mx/handle/20.500.12055/777>
- lark, D., dos Reis Buzzo, A. J., Garcia, J. A. A., Côrrea, V. G., Helm, C. V., Corrêa, R. C. G., ... & Peralta, R. M. (2019). Enzymatic degradation and detoxification of azo dye Congo red by a new laccase from Oudemansiella canarii. *Bioresource technology*, 289, 121655. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121655>
- Kuhad R.C., Sood N., Tripathi K.K., Singh A. y Ward O.P., 2004. Developments in microbial methods for the treatment of dye effluents. *Adv. Appl. Microbiol.*, 56, 185-213.
- Legerská, B., Chmelová, D., & Ondrejovič, M. (2018). Decolourization and detoxification of monoazo dyes by laccase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Journal of biotechnology*, 285, 84-90. DOI: [10.1016 / j.jbiotec.2018.08.011](https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.08.011)
- Lira Gómez, Carlos Federico. (24 de agosto de 2019). *Trametes versicolor*: características, reproducción, propiedades. Lifeder. Recuperado de <https://www.lifeder.com/trametes-versicolor/>.
- Marcano, D. (2018). Introducción a la Química de los colorantes. Colección Divulgación Científica y Tecnológica. Academia de Ciencias Físicas, Matemáticas y Naturales, Caracas, Venezuela. 254 p

- Martínez, A. C., Olivares, C. C., Lozada, A. E., & Ramírez, C. G. (2014). Contaminación generada por colorantes de la industria textil. *Vida Científica Boletín de la Escuela Preparatoria No. 4*, 2(3).
- Martínez, T. (2011) Biosorción del colorante congo en sistemas en lote utilizando biomasa de *Chlorella* sp. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Nuevo León, México
- Morales, L. G. M. (2022). Combinación de ZnO o TiO₂ con nanopartículas de oro para la remoción del colorante Naranja de Metilo del agua.
- Murcia, M. D., Gómez, M., Ortega, S., Hidalgo, A. M., Gómez, E., & Gómez, J. L. (2015). Degradación de rojo congo en un fotorreactor tubular de tecnología excimer. Estudio cinético. *Afinidad*, 72(569).
- Páez, L. M. (2012) Determinación de la actividad enzimática de lacasas y lignina peroxidasas de hongos degradadores de colorantes seleccionados para el tratamiento de aguas residuales de la industria textil. Tesis para ingeniería escuela Politécnica del Ejército Sangolquí Ecuador. <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/5261/1/T-ESPE-033267.pdf>
- Ramsay, J. A., & Nguyen, T. (2002). Decoloration of textile dyes by *Trametes versicolor* and its effect on dye toxicity. *Biotechnology Letters*, 24(21), 1757-1761.
- Saha, R., & Mukhopadhyay, M. (2020). Elucidation of the decolorization of Congo Red by *Trametes versicolor* laccase in presence of ABTS through cyclic voltammetry. *Enzyme and microbial technology*, 135, 10950 <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.109507>
- Selvam, K., Priya, M. S., & Yamuna, M. (2012). Decolourization of azo dyes and dye industry effluents by lignin degrading fungus *Trametes versicolor*. *Int. J. Pharm. Biol. Arch*, 3(3), 666-672.
- Shekher, R., Sehgal, S., Kamthania, M. y Kumar, A. (2011). Lacasa: fuentes microbianas, producción, purificación y posibles aplicaciones biotecnológicas. *Investigación de enzimas*, 2011.
- Solorio, A. B., & Salgado, I. T. (2022). Diversidad biológica e importancia cultural del estado de Morelos. *Diversidad Biológica (Volumen I)*.

- Stoilova, I., Krastanov, A. y Stanchev, V. (2010) Propiedades de la lacasa cruda de *Trametes versicolor* producida por fermentación en sustrato sólido. *Avances en Biociencia y Biotecnología*, 1, 208-215.____doi: 10.4236/abb.2010.13029.

11. Anexo

Zimogramas

Buffer Lower (Separador) 4X

- ✚ Tris 18.17 g, disolver en 50 mL de agua destilada
- ✚ SDS 20 %: 2 mL (para 20 %: 10 g de SDS en 50 mL en agua)
- ✚ Aforar a 100 mL y ajustar el pH 8.8

Buffer Upper (concentrador) 4X

- ✚ Tris 6.06 g, disolver en 50 mL de agua destilada
- ✚ SDS 20%: 2 mL (para 20 %: 10 g de SDS en 50 mL en agua)
- ✚ Aforar a 100 mL y ajustar el pH 6.8

Solución de acrilamida

- ✚ Acrilamida 30%: 49.5 g
- ✚ Bis-acrilamida 0.8%: 1.32 g
- ✚ Aforar a 165 mL con agua destilada

APS 10%

- ✚ Persulfato de amonio: 0.1 g en 1 mL de agua destilada

Buffer de corrida TANK, 10X.

- ✚ Tris 15.2 g
- ✚ Glicina 7.21 g
- ✚ SDS 20%: 25 mL
- ✚ Aforar a 500 mL de agua destilada a pH 8

Buffer de carga 2x, 12 mL.

- ✚ Upper Buffer 4X: 9.36 mL
- ✚ Glicerol 20%: 2.4 mL
- ✚ Azul de bromofenol 0.2%: 0.024 g
- ✚ SDS 20%: 240 μ L

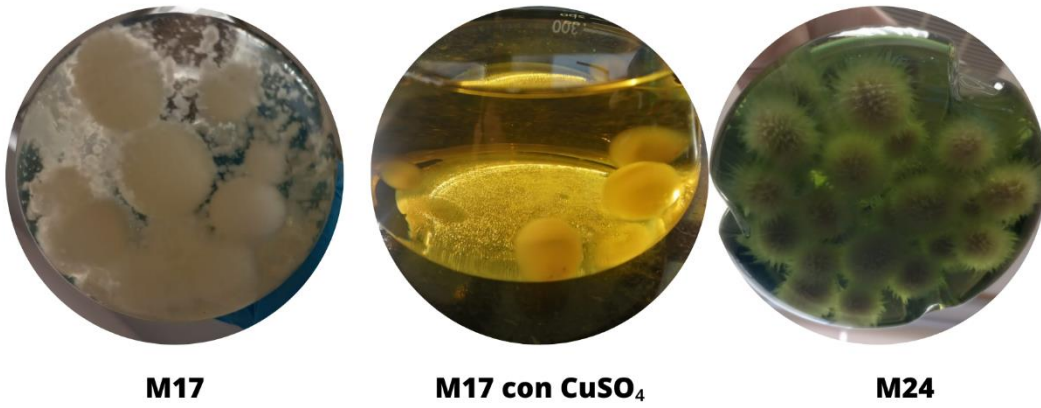


Figura17: Crecimiento de *Trametes versicolor* en liquido en los diferentes medios sin colorante(control)

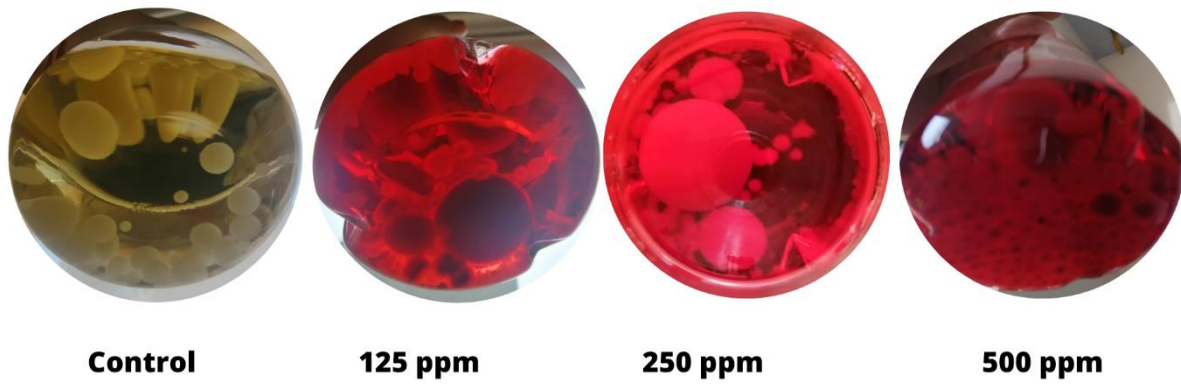


Figura 18: Crecimiento de *Trametes versicolor* en liquido del medio M17 a las diferentes concentraciones del colorante

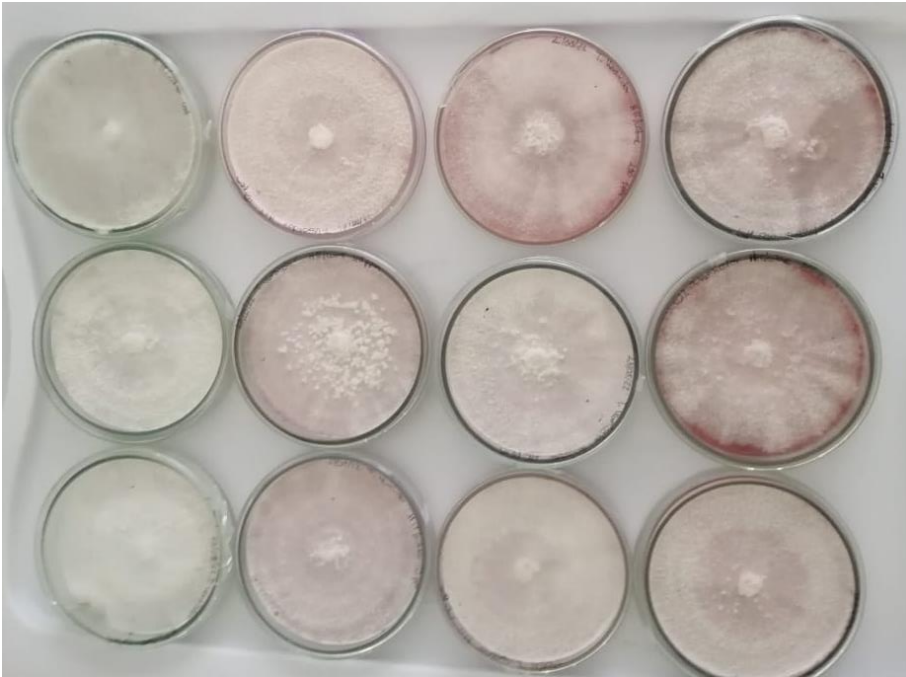


Figure 19. Crecimiento de *Trametes versicolor* en caja de Petri en el medio HIT



Figure 20. Crecimiento de *Trametes versicolor* en caja de Petri en el medio M17



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Licenciatura en Biología

Programa Educativo de Calidad Acreditado por el CACEB 2018-2023

Cuernavaca, Morelos a 27 de septiembre de 2023

DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE
DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES
P R E S E N T E.

Por este conducto, los catedráticos suscritos comunicamos a Usted, que hemos revisado el documento que presenta la Pasante de Biólogo: **C. CHÁVEZ GARCÍA JAQUELINE**, con el título del trabajo: **Degradación de rojo congo mediante la enzima lacasa del hongo *Trametes versicolor* (Fungi Basidiomycota)**

En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para optar por la Modalidad de Titulación por Tesis Profesional por Etapas como lo marca el artículo 26° del Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

A T E N T A M E N T E
Por una humanidad culta

JURADO REVISOR

FIRMA

PRESIDENTE: DRA. MARÍA DE LOURDES ACOSTA URDAPILLETA

SECRETARIO: DRA. MAURA TÉLLEZ TÉLLEZ

VOCAL: DRA. ELBA CRISTINA VILLEGAS VILLAREAL

SUPLENTE: M. EN B. ELIZABETH CUEVAS REYES

SUPLENTE: M. EN C. DANIELA ALEXIS LÓPEZ GALINDO



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MAURA TELLEZ TELLEZ | Fecha:2023-09-28 12:37:43 | Firmante

Lj7oOwGPI9C/285IcuZMwAoFhfWFuPCKZ9/c8i9fe1IVw0F59zPOtiyeoOOPKOPwReejkA5SMuo2EWf6cz7LTBxJ7S/+7sCO9hjd6iHEC2yQ3jLBBa1BsymYqfBxTpO6jU0cu/zezh ERgNymUsLG+kj+5/yuwNMBwfvifNHvLDFu5bR9de4xVJr9ZDoVFRliZfoBUxeX1Kv9IOQGmlhTyKelJ/BmzczwJkplZf+pvNH+t7/e2NWJgO4n5ia8Lyi8ZiM8Ewa5jvfty2YXvxb+Hx gnGb0jyxTp8hUunsitGGxcSFpxMEJP2Gvagku9kir7xafThprn917YBbm/vw==

MA DE LOURDES ACOSTA URDAPILLETA | Fecha:2023-09-28 16:32:01 | Firmante

JgLsl8MpYrNwyiBYaYaGG66EQd7HHQ9RgnvH5b3U+3wzbaZzlXoapfJWdJe/ylaraXx+8FVKW1YZL8PnD59Oe4Pz8GHfWchMPhyLuAM6NbM/0xa+YWVMqrlGw1rhXMBh4kfz AsoFoJuHhjivIoC5MjMplvcbPBFQVQFumhmyig1+6N9Sq6on5ay3YpY7wefKzmE+OhZjl3acc1+r0jx/p49Zzh7cMucpsR45SV1KjPSPtoRUfTmsu/yH4m/ErNh3zLE0xs0ZY0jO7hNY v389o6QwBCDZVhHxCMWAKplLnO4dHwNer6pAkl8ff99qJ0Hd9DAQ5bKt28AwfoFaAUKQ==

ELBA CRISTINA VILLEGAS VILLARREAL | Fecha:2023-09-29 11:02:27 | Firmante

V6ztXKUTBLnpR9ioOrsCJRnYDH2t5Lsnem4JNGd7w3LW8iwh8AJYTsNVRToUrbxykj4r5dbcAz7r7V8oKpaKXyhVVQB+RPO+XBDGNCKSD0WoZ1kClf7nNEKM4J2V+/hlcDLXD UEeg0btOXU5AZqYszFAVAOestETpZ87B9SPu/y5mNmopJd/m05WgLKSVkPkYKldrx7izd2Fnb8L5lfsxhwgOxcSZRkvHKMSPd+xnyQUdihCSfMM43C5JyZY5VRLBN+oAKhAsLr T5tp+PftMrZ1jo3DfzfxQNeLSKD12mlaFhvsO0doVHmgTC9nzy7AnXhMHPimiDiMtBuv5j2h1ew==

DANIELA ALEXIS LÓPEZ GALINDO | Fecha:2023-09-29 11:23:47 | Firmante

E53+qqXT1XvM3cOEEkHsAWGvfmCEXpIhmGuodmj3TDBcylZJ66GjHxUxHu6FrijMxDZ42VCyU29oHU+XM5Mvb4koA36/EizBcl34kmk446IWuHsG83w4mvFdRfyz+kZMihOns eRE1LCtpwF+hgCvE4rEbF1+2Od49ba+MbauqgRMx1qsOPvDtQoJlWoIR0AZOVFTrggpYnH5Les35HFzEdY34ndarSgqx0pfnr39qMdlU0PprEE4gPSUsLZHx68EV7xH4zmAFFB u88w4bdcwnFA+IkRxpvrbyrPTNPrvY9zLCRZWoDzzixOfed49ZVMlpBusDjSkelPpPfqUINmXQ==

ELIZABETH CUEVAS REYES | Fecha:2023-09-29 18:31:21 | Firmante

APCNT/P3OhxEj+DTikR94rdTWSWSA+4tADpy1RQYIQ/9379cn00Brq42pj1kFrBnHgzW2f+ibq//xzooTz2kWDRPZIDa2dWS9ZmDgm8D/rE5PnWHLKlcsWBParjrhDXhrBTQ3+7 PzarJhlQBcz7YJOp4pJEvGeAqi9ADmpSggv1dW+jjHLvUruBh3yyUOl6aPOVzXfxyzGqtN/HUOzg7A4kJqSEQL/i5nODpYpTxCZaHO+1ZiErNzBpBRaTYhwpeXoXR+gAubO/KXP w/WAZRH1GrHkWLfkuzkiY3HA8s7e7lBcJw4wZjGbGonfO5nNz29+dp/iV8KMsPSVfPMKsTGW==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



ZCXDu3GfK

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/uajEnwHJk2XUUHjKPs13P44enn8loPO>

